

可溶性 TRAIL 蛋白的高密度培养及补料策略研究

章 越¹ 沈亚领^{1*} 夏小霞¹ 孙爱友¹ 魏东芝^{1*}
周劲松² 张国钧² 王梁华³ 焦炳华³

¹(华东理工大学生物化学研究所,生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

²(上海恰尔生物技术有限公司,上海 200336)

³(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433)

摘 要 采用分批补料的方法高密度培养重组大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 制备可溶性 TRAIL 蛋白,优化发酵工艺,探索简单高效的分离纯化方法并测定蛋白生物活性。通过比较几种不同的补料策略:间歇流加、DO-stat、pH-stat,摸索了一种流加策略,即 DO-stat-pH-stat 组合流加,有效的避免了发酵过程中,尤其是诱导表达阶段乙酸积累的增加,使 TRAIL 蛋白在高密度培养条件下,得到高效表达。菌体密度最终达到 300g/L (WCW) 以上,可溶性 TRAIL 蛋白占菌体总蛋白的 4.2%,含量为 1.1g/L。在整个发酵过程中,乙酸浓度接近于 0,且未使用任何特殊手段,如纯氧、加压等,简化了发酵工艺,降低了发酵成本,为 TRAIL 的工业化生产创造了条件。

关键词 重组大肠杆菌,分批补料,发酵,TRAIL,分离纯化

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0408-06

TRAIL,即肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 家族成员之一,又称凋亡素 2 配体(apoptotin 2 ligand, Apo-2L)。它具有良好的抗肿瘤效果,同时对正常组织和细胞代谢没有影响,因此成为国内外研究的热点^[1-2]。

大肠杆菌一直因为具有容易培养、生长速度快、遗传学资料丰富等特点,作为重组蛋白的表达系统而被广泛使用。高密度培养技术(High Cell-Density Culture, HCDC)的出现^[3-5],大幅度提高了重组蛋白的产量和产率,降低了发酵成本,为重组大肠杆菌的应用提供了更为广阔的空间,大量重组蛋白通过该表达系统得到高效表达^[6-7]。重组大肠杆菌高密度培养普遍采用分批补料(fed-batch),主要包括指数流加、DO-stat^[8]和 pH-stat^[9]等几种流加方式。每种流加策略,相对于其他策略,都不可避免的具有某些优势和局限性。例如 DO-stat 虽然可以提供较大的初始菌体得率和稳定的过程控制,避免溶氧的抑制,但同时发酵过程中 $K_L a$ 的波动,会对补料速率和比底物消耗速率产生不利影响,这种波动往往出现在诱导阶段^[10]。因此,选择合适的流加策略,创造适

合菌体生长的条件,常常成为达到高密度和高表达的关键。我们通过对几种不同流加策略的比较,确定了一种特殊的补料策略,避免了乙酸的积累,成功地在高密度下高效表达出具有生物活性的 TRAIL 蛋白,为进一步放大打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:重组大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 由第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室构建,上海恰尔生物技术有限公司提供。

1.1.2 培养基:

平皿培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母粉 5、NaCl 5、琼脂 20。摇瓶培养基(g/L):蛋白胨 5、酵母粉 5、NaCl 5、葡萄糖 5。发酵培养基(g/L):蛋白胨 10、酵母粉 10、葡萄糖 10、 NaH_2PO_4 2、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7、 K_2HPO_4 3、 H_2O 4、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25 和金属离子。补料培养基(g/L): (1)葡萄糖 700 (2)蛋白胨 175、酵母粉 175、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5。

1.1.3 设备和试剂:Bioengineering 公司 3.7L 发酵系统和 B. Braun 公司 Biostat-B 5L 发酵系统,蛋白胨、酵

收稿日期 2003-10-29,修回日期 2004-01-14。

基金项目 国家重大科技专项基金资助(No.2002AA2Z345A)。

* 通讯作者。 Tel 86-21-64250068; Fax 86-21-64250068; E-mail zhangyue@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

母粉为 OXOID 公司产品,其余为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:

(1)灭菌方法:发酵培养基(除磷酸盐)加入发酵罐中,在位灭菌,121℃灭菌 20min,磷酸盐和补料培养基分别溶解后,121℃灭菌 30min,发酵培养基接种前加入氨苄青霉素至 100 μg/mL。

(2)菌株活化方法:取 -70℃ 保存菌株甘油管,二次摇瓶活化(30℃,220r/min,10h)后,接种于平皿中,4℃ 保存,可用 4 周。

(3)种子制备方法:取 4℃ 保存平板转接入另一平皿中,30℃ 培养 16h,然后挑单菌落于 100mL 摇瓶培养基中,30℃,220r/min 过夜培养。

(4)摇瓶实验:

乙酸对表达的影响:在摇瓶(500mL)中加入 50mL LB 培养基,30℃,220r/min 培养 8h,达到一定密度后,开始诱导,诱导前在不同的摇瓶中加入不同浓度乙酸钠溶液(灭菌)至不同浓度(g/L):0、5、10、15、20,42℃ 诱导 4h,收集菌体后,测定可溶性 TRAIL 蛋白的表达量。诱导时间的确定:在摇瓶(500mL)中加入 50mL LB 培养基,30℃,220r/min 培养 8h,达到一定密度后,开始诱导,分别诱导不同时间,收集菌体后,测定可溶性 TRAIL 蛋白的表达量。

(5)发酵罐培养:发酵采用 B. Braun 公司 Biostat-B 5L 发酵罐和 Bioengineering 公司 3.7L 发酵罐,初始发酵液体积分别为 2.5L 和 1.5L,5% 接种量接入种子液,通气量 1vvm,发酵温度为 30℃,发酵分为三个阶段,第一阶段为分批培养(Batch)阶段,溶氧逐渐下降,分步提高转速,控制溶氧在 30% 以上,当基础料中葡萄糖耗尽,溶氧和 pH 上升后,进入分批补料(Fed-batch)阶段,串联(cascade)溶氧和搅拌转速,控制溶氧 20%,同时按不同策略流加葡萄糖和氮源,维持菌体生长,当平均比生长速率小于 0.05h^{-1} 后,开始诱导(Induce)阶段,42℃ 诱导 4h 后,放罐。整个发酵过程中,用 25% 氨水维持 pH 在 7.0 左右,每 2 小时取样 1 次,用于各种参数的检测,以下皆同。

(6)补料策略:

间歇流加:间隔 30s,流速 0.38mL/min,流加葡萄糖,并按固定比例,流加氮源,必要时切换至手控。DO-stat 流加:根据菌体生长需要和发酵体积的变化,在恒定溶氧的条件下,近似指数流加葡萄糖和氮源,控制平均比生长速率在 0.15h^{-1} 左右。DO-stat-pH-stat 组合流加:所谓组合流加,即在发酵开始阶段,首先采用 DO-stat 流加培养,方法与上述相同,当

设备供氧达到极限后,改用 pH-stat 方法培养,即用葡萄糖的流加代替酸,控制发酵过程中的 pH,维持在 7.0 左右,直到发酵结束。

1.2.2 分析方法:

菌体浓度测定:发酵液取样 10mL,10 000r/min 4℃ 冷冻离心 10min 后,称量菌体湿重。

葡萄糖浓度测定:发酵液 10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 10min 后,取上清葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所)检测。

乙酸浓度测定:取 1mL 发酵液 10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 10min,取上清液 0.50mL,加入 0.3g NaCl、0.10mL 2.3mol/L H_2SO_4 、2.5mL 乙醚,在振荡器上混合 1min,5 000 r/min 离心 3min,取乙醚相 1mL 加 0.20mL 0.10mol/L NaOH 混合 1min,5 000 r/min 离心 3min,吸弃上层乙醚后置干燥器内干燥,再加入 0.40mL 0.05mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (pH2.6)溶解,10 000 r/min 离心 10min,取 5 μL 进样,HPLC(Agilent 1100) 250mm × 4.6mm C_{18} 柱(Agilent 公司)210nm 检测。

TRAIL 蛋白表达测定与计算:取离心后菌体,PBS 清洗 2 次,将菌体按 1:10(W/V)悬浮于 PBS 中,超声波破碎 200W、200s 后(新芝科器),10 000 r/min 4℃ 冷冻离心 15min,取上清,作 SDS-PAGE 凝胶电泳,采用凝胶扫描系统(复日科技)扫描测定纯度,同时采用 Bradford 试剂盒(Bio-Rad)检测样品中菌体总蛋白浓度。可溶性 TRAIL 蛋白的浓度 = 上清中总蛋白浓度 × 可溶性 TRAIL 蛋白占上清总蛋白的比例。

TRAIL 蛋白的初步纯化:收集菌体后,用含有 20 mmol/L EDTA 的 50mmol/L PBS(pH = 7.4)溶解进行超声破菌,离心后,上清蛋白直接过镍金属亲和层析柱(Qiagen)分离,收集目标峰后再过 CM-Sepharose(Pharmacia)柱,最终蛋白纯度可达 95%。

TRAIL 蛋白活性测定:采用 MTT 法测定蛋白生物活性。在 96 孔板中,每孔接种 200 μL 的胰腺癌 1990 细胞培养液(2×10^4 个),培养 10h 后加入可溶性 TRAIL 蛋白液,18h 后加入 20 μL 5mg/mL 的 MTT,继续培养 4h 后吸弃培养上清液,再加入 150 μL DM-SO,振荡 10min 使结晶物充分溶解,酶标仪比色(Sigma)。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶实验

2.1.1 乙酸浓度对可溶蛋白表达的影响:从图 1 中可以看出,乙酸离子的存在严重抑制了 TRAIL 蛋白的表达,因此菌体达到高密度并开始诱导以后,能

否在菌体的诱导阶段避免乙酸的积累,成为是否能够真正实现高表达的关键。

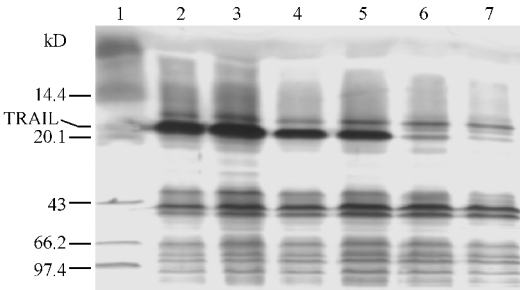


图 1 蛋白表达量和乙酸浓度的关系

Fig.1 Expression of soluble TRAIL at different concentration of acetic sodium

1:protein marker 2 3 4 5 6 7:soluble TRAIL protein after induction in the 0, 0, 5, 10, 15, 20g/L acetic sodium medium respectively

2.1.2 诱导时间的确定:在摇瓶实验中,我们发现诱导 4h 后,可溶性 TRAIL 蛋白的表达量不再增加,这个结果在此后的发酵罐实验中得到了验证(数据没有显示),因此在下面的实验中,诱导时间均为 4h。

2.2 菌体生长情况

2.2.1 间歇流加培养:接种后,溶氧和 pH 值持续下降,大约 8h 以后,伴随着溶氧和 pH 值的突然上升,表明葡萄糖已经耗尽,此时可以开始补料,加入葡萄糖和氮源以后,溶氧迅速下降,菌体利用以后,溶氧又再次反弹。间歇流加造成较大的溶氧振荡,同时易产生大量乙酸,生长过程不稳定,不利于菌体的持续稳定增长,也不利于发酵在线调控。发酵过程中溶氧、转速、菌体密度以及乙酸的变化,见图 2、图 3。

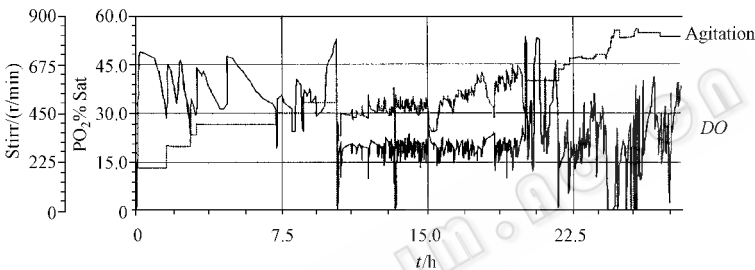


图 2 发酵过程中溶解氧和转速的变化

Fig.2 The change of dissolved oxygen and agitation during the fermentation with discontinuous feeding

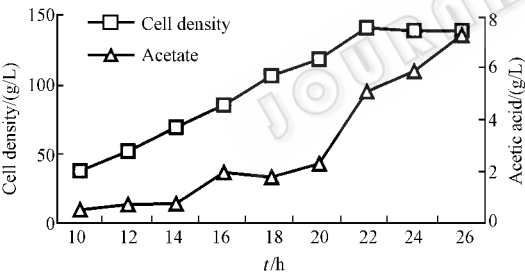


图 3 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线

Fig.3 The change of cell density and acetate concentration during the fermentation with discontinuous feeding

2.2.2 DO-stat 培养:接种后 8h,伴随着溶氧和 pH 值的突然上升,开始补料,串联搅拌和溶氧,控制溶氧 20%,连续流加葡萄糖和氮源,限制菌体的平均比生长速率,控制在 $0.15h^{-1}$ 左右,菌体得以持续增长,随着菌体浓度的增加,搅拌速度也基本呈线性增加,18h 搅拌达到上限,不再提高补料速度,但仍然无法避免发酵后期和诱导阶段乙酸的严重积累,导致最后几小时菌体浓度略有下降。发酵过程中溶氧、搅拌、菌体密度以及乙酸的变化,见图 4 和图 5。

2.2.3 DO-stat-pH-stat 组合培养:为了解决发酵后期乙酸积累的问题,再次对发酵工艺进行了调整,发

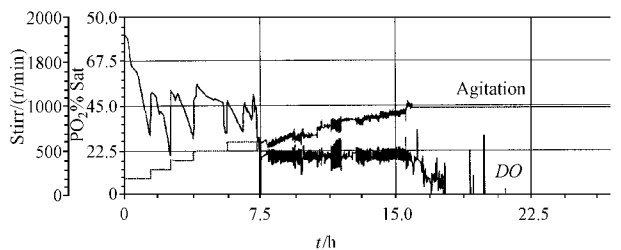


图 4 发酵过程中溶解氧和转速的变化

Fig.4 The change of dissolved oxygen and agitation during DO-stat fermentation

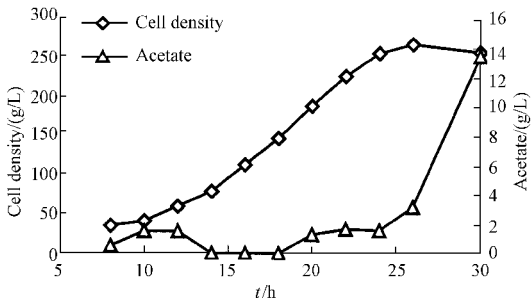


图 5 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线

Fig.5 The change of cell density and acetate concentration during DO-stat fermentation

酵前期采用 DO-stat 方式培养,以期得到较快的比生长速率($0.15h^{-1}$),当设备的供氧能力达到设备上限以后,采用 pH-stat 的方法调控发酵,即用葡萄糖代

替酸液 ,控制发酵液 pH 值 ,当发酵液中葡萄糖浓度较底时 ,菌体利用氮源 ,放出氨 ,pH 值上升 ,加入葡萄糖后 ,菌体优先利用葡萄糖 ,放出大量 CO₂ ,pH 值又下降 ,不断加入葡萄糖 ,控制 pH 值在 7.0 左右 ,直到诱导结束。发酵中菌体密度、乙酸浓度和葡萄糖浓度变化 ,见图 6~8。为了进一步优化表达 ,我们对比了不同密度下 ,菌体的表达情况 ,不难看出 ,虽然在低密度下表达 ,可溶性 TRAIL 蛋白的比例有所提高 ,但总表达量仍然较低 ,因此 ,在高密度的前提下 ,真正实现高表达才是提高产量的关键(见表 1)。

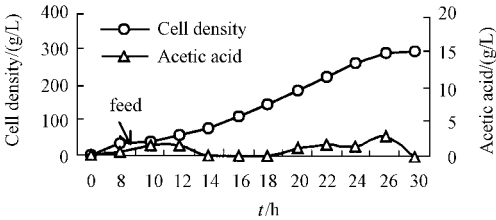


图 6 发酵过程中菌体密度、乙酸积累的变化曲线
Fig.6 The change of cell density and acetate concentration during the fed-batch cultivation

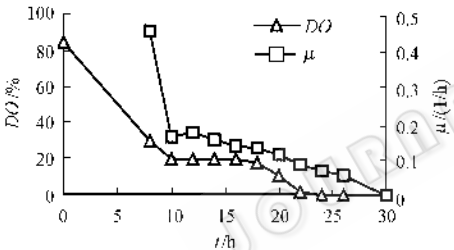


图 7 发酵过程中溶氧和比生长速率的变化曲线
Fig.7 Effect of dissolved oxygen on specific growth rate during the fed-batch fermentation

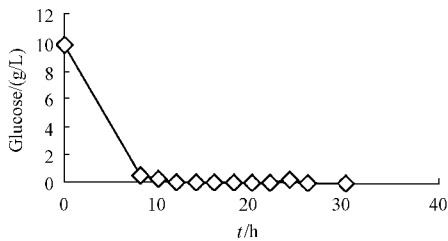


图 8 发酵过程中葡萄糖浓度的变化
Fig.8 Time profile of glucose concentration during the whole cultivation

从上述几种补料方式的比较结果可以看出 ,间歇补料培养溶氧振荡较大 ,发酵曲线混乱 ,乙酸积累也较多 ,抑制菌体生长 ,菌体密度(湿菌)仅为 150g/L。DO-stat 培养克服了间歇补料培养中的许多缺点 ,例如溶氧大幅振荡、乙酸过量积累等 ,同时提供了较大

表 1 不同密度下表达量的比较

Table 1 TRAIL production based on different cell density		
Cell density(g/L)	Proportion of soluble TRAIL protein in total protein/ %	Expression of soluble TRAIL(g/L)
157	4.4	0.64
260	3.9	0.92

的初始菌体得率和稳定的生长过程 ,避免了溶氧的抑制 ,有利于发酵的在线调控 ,菌体密度(湿菌)也达到 250g/L。然而 ,采用 DO-stat 培养 ,虽然在发酵前期供氧充足的情况下 ,可以提供较快的生长速度 ,但是由于设备的供氧能力有限 ,18h 以后溶氧开始下降 ,尤其当诱导以后 ,发酵液粘度增加 ,泡沫增多 ,发酵液物理性质的变化引起 K_La 的波动 ,导致比葡萄糖利用速率降低和发酵后期乙酸的积累 ,乙酸浓度达到 13.5g/L ,严重抑制了蛋白的表达 ,目标蛋白电泳条带几乎不可见。在发酵后期采用 pH-stat 方式补料 ,在提供菌体营养的同时 ,可以避免因为葡萄糖浓度过高而导致的乙酸积累 ,不仅菌体密度在 18h 以后进一步增长 ,表达量也大大提高。采用 DO-stat-pH-stat 混合培养 ,菌体密度(湿菌)达到 300g/L ,可溶性 TRAIL 蛋白占菌体总蛋白的 4.2% ,表达量为 1.1g/L ,发酵结束时乙酸浓度接近于 0。

2.3 蛋白的初步纯化

收集菌体以后 ,TRAIL 蛋白可溶部分通过两步纯化 ,可以得到纯度为 95% 以上 ,见图 9。

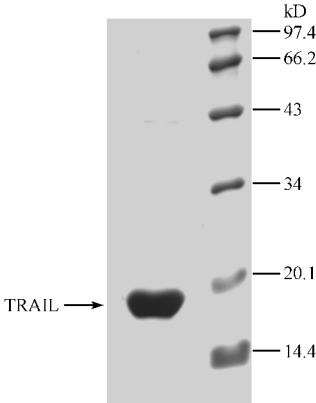


图 9 纯化后的 TRAIL 蛋白

Fig.9 The SDS-PAGE analysis of purified TRAIL protein

2.4 蛋白活性的检测

采用 MTT 法测定 TRAIL 可溶蛋白的活性 ,对胰腺癌细胞 1990 有明显杀伤作用 ,IC₅₀ 为 1.6μg/mL (数据没有显示)。

3 讨论

高密度发酵技术越来越多的用于实际生产,其关键问题是解决乙酸的积累等问题。

乙酸是大肠杆菌发酵过程中主要的有害副产物,乙酸的积累对 C600/pBV-TRAIL 的生长和蛋白的表达有明显的抑制作用。有文献报道,当比生长速率高于 0.20 h^{-1} (μ_{crit})^[11] 时,就会产生乙酸。利用高密度培养技术,选择合适的补料策略,从而达到控制菌体比生长速率的目的,使菌体的比生长速率不超过 μ_{crit} ,明显减少了乙酸的产生,菌体真正达到高密度。然而,菌体密度的增加,发酵液颜色变深,菌体耗氧增加,使溶氧成为限制因素,可以看出当供氧能力达到设备极限后,比生长速率随之下降,不利于菌体的进一步生长,特别是诱导阶段,发酵环境发生变化,因而引起 K_{La} 的波动,如果不改变相应的调控策略,势必造成乙酸积累增加,影响蛋白的表达。另一方面,我们也能看出,在溶氧下降的情况下,菌体的代谢会发生相应改变,发酵环境非常复杂,乙酸的生成往往是许多因素共同作用的结果,但是只要调控得当,菌体密度仍然可以进一步提高,乙酸的积累也是可以避免的。

实验证明,利用大肠杆菌 C600/pBV-TRAIL 高密度发酵 TRAIL 蛋白,是可行的。我们在整个发酵过程中,并未使用特殊手段,如纯氧、加压等,为工业化创造了条件。通过大量的实验,发酵工艺已经确定,但在高密度发酵的前提下,表达的结果,仍然可以进一步优化,这是我们的后续研究课题。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ. Identification and characterization of a new member of the THF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, **3**(6): 673–682
- [2] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S *et al.* Induction of apoptosis by a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, **271**(22): 12687–12690
- [3] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbial Biotechnol*, 1999, **51**: 422–430
- [4] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 1995, **39**: 59–65
- [5] Sang Yup Lee. High-cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1996, **14**: 98–105
- [6] Riesenber D, Menzl K, Sumann K *et al.* High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl Microbial Biotechnol*, 1990, **34**(1): 77–87
- [7] Sung Kwan Yoon, Seon Hun Kwon, Kahru A *et al.* Optimization of *Escherichia coli* fed-batch fermentation for bovine somatotropin. *Biotechnology Letters*, 1994, **16**: 1119–1124
- [8] Yano T, Kobayashi T, Shimizu S. High concentration cultivation of *Candida brassicae* in a fed-batch system. *J Ferment Technol*, 1985, **63**: 415–418
- [9] Park YS, Kai K, Iijima S *et al.* Enhance β -galactosidase production by high cell-density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **40**: 686–696
- [10] Castan A, Enfors SO. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. *Bioprocess Engineering*, 2000, **22**: 509–515
- [11] Paalme T, Tiisma K, Kahru A *et al.* Glucose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **35**: 312–319

High-cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* for Production of TRAIL by Using a 2-stage Feeding Strategy

ZHANG Yue¹ SHEN Ya-Ling^{1*} XIA Xiao-Xia¹ SUN Ai-You¹ WEI Dong-Zhi^{1*}

ZHOU Jin-Song² ZHANG Guo-Jun² WANG Liang-Hua³ JIAO Bing-Hua³

¹(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

²(Shanghai Trail Bio-technical Co. Ltd, Shanghai 200336, China)

³(Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract *Escherichia coli* was genetically engineered to produce recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (Apo2L/TRAIL) using a temperature-inducible expression system. To create a fed-batch culture condition that allows efficient production of TRAIL, different feeding strategy including discontinuous, DO-stat and pH-stat feeding strategies were compared. Then, a special 2-stage feeding strategy was developed. High concentration of biomass (300g wet cell weight per liter of culture broth) and active soluble TRAIL protein (1.1g/L) was obtained by applying a high-cell-density cultivation procedure with

the 2-stage feeding strategy .

Cultivation of recombinant *E. coli* was started as a batch process at 30℃ and then followed by fed-batch culture when the dissolved oxygen concentration presented a steep increase resulted from the exhaustion of glucose in the medium. At the first phase of fermentation(batch phase), agitation rate was enhanced to control dissolved oxygen at 30 percent . When glucose in the medium was used up , indicated by a sudden rise in pH value and dissolved oxygen , the second phase(fed-batch phase) was started with glucose and nitrogen resource being supplied automatically. At the beginning of fed-batch operation , stirrer rate was cascaded with dissolved oxygen signals to keep it at 20 percent(DO-stat). During the fed-batch phase , glucose was limited to control the specific growth rate under the critical value μ_{crit} to avoid acetic acid excretion. When the stirrer speed arrived at its up-limit , the flow rate of feed was kept constant. In the inducing phase(42℃ for 4h) glucose was fed as a pH regulating agent (pH-stat) and the specific growth rate and dissolved oxygen decreased sharply. Aqueous ammonia was used for maintaining pH value at 7.0 throughout the first two phases. In the whole fermentation , acetic acid concentration didn 't exceed 2.9 g/L. At the end of the high-cell-density cultivation process , no acetic acid could be detected in the medium. These results indicated that our fed-batch strategy was able to prevent acetate accumulation significantly. Although high cell density has been achieved , the induction process was not optimized satisfactorily and much work should be done further. Furthermore , since no special ways , like pure oxygen , pressure , has been used in our experiments , this efficient approaches would be useful not only in a pilot scale but also in an industry scale.

Finally , simple purification procedure based on immobilized metal affinity column(IMAC) and CM-Sepharose column was implemented to isolate the TRAIL. Yields of more than 800mg TRAIL per liter of culture broth were obtained , the final purity reaching more than 95% . The purified TRAIL showed strong cytotoxicity activity against human pancreatic 1990 tumor cells , with ED_{50} about 1.6 μ g/mL.

Key words Fed-batch , fermentation , *Escherichia coli* , TRAIL , purification

Received : 10-29-2003

This work was supported by Grant from the Key Subject of Chinese High-tech Program(No.2002AA2Z345A).

* Corresponding author. Tel 86-21-64250068 ; Fax 86-21-64250068 ; E-mail :dzhwei@ecust.edu.cn